

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

C12N 9/10

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15634

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

1. April 1999 (01.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05770

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. September 1998  
(10.09.98)

(30) Prioritätsdaten:  
197 41 489.3 19. September 1997 (19.09.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS  
RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG  
[DE/DE]; Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K801,  
D-65926 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIY, Thomas [DE/DE];  
Loreleistrasse 14, D-65929 Frankfurt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,  
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.

"Express Mail" mailing label  
number EK219455103

Date of Deposit  
- March 17, 2000 -

I hereby certify that this paper or fee is  
being deposited with the United States Postal  
Service "Express Mail Post Office to  
Assess" service under 37CFR 1.10 on the  
date indicated above and is addressed to the  
Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, D.C. 20231

-Carrie A. McPherson-

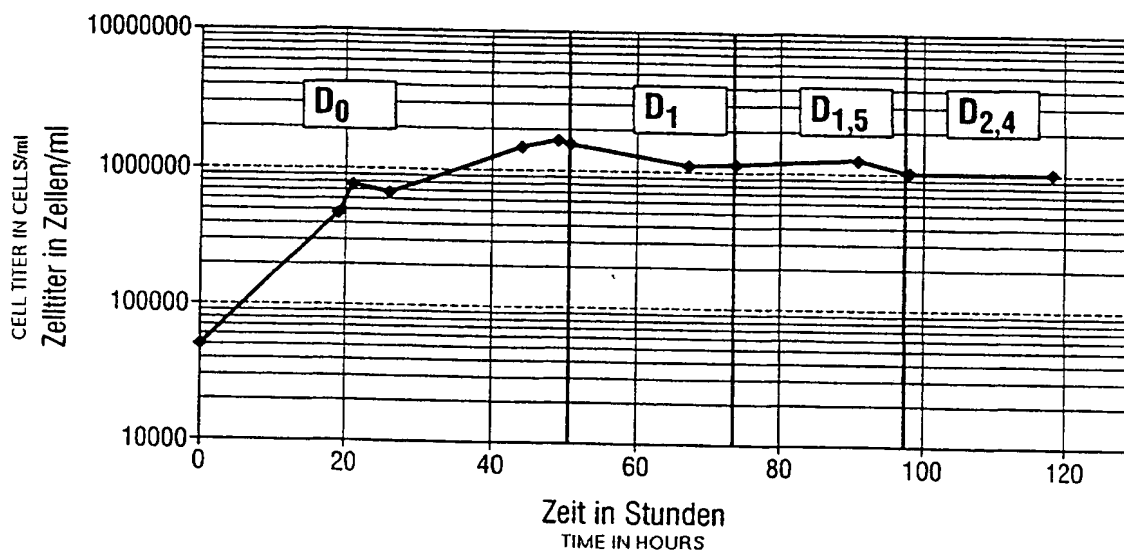
(Typed or printed name of person mailing

paper or fee)

(Signature of person mailing paper of fee)

(54) Title: FERMENTATION METHOD WITH CONTINUOUS MASS CULTIVATION OF CILIATES (PROTOZOA) FOR PRODUC-  
ING BIOGENOUS VALUABLE SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: FERMENTATIONSVERFAHREN MIT KONTINUIERLICHER MASSENKULTIVIERUNG VON CILIATEN (PRO-  
TOZOA) ZUR PRODUKTION BIOGENER WERTSTOFFE



(57) Abstract

The invention relates to a fermentation method with continuous mass cultivation of ciliates (protozoa) in which the ciliate cells are cultivated in a complex axenic medium free of living feeding organisms or predatory organisms. The biomass containing the desired biogenous valuable substances are obtained by means of continuous (permanent) cell extraction.

INTERNATIONAL APPLICATION -with- Search Report  
1997/F-237 (5822\*181)

### (57) Zusammenfassung

Bei dem erfindungsgemäßen Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) werden die Ciliatenzellen in komplexem, axenischem Medium – frei von lebenden Futter- bzw. Beuteorganismen – kultiviert, und die die gewünschten biogenen Wertstoffe enthaltende Biomasse wird durch kontinuierlichen (permanenten) Zellaustrag gewonnen.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

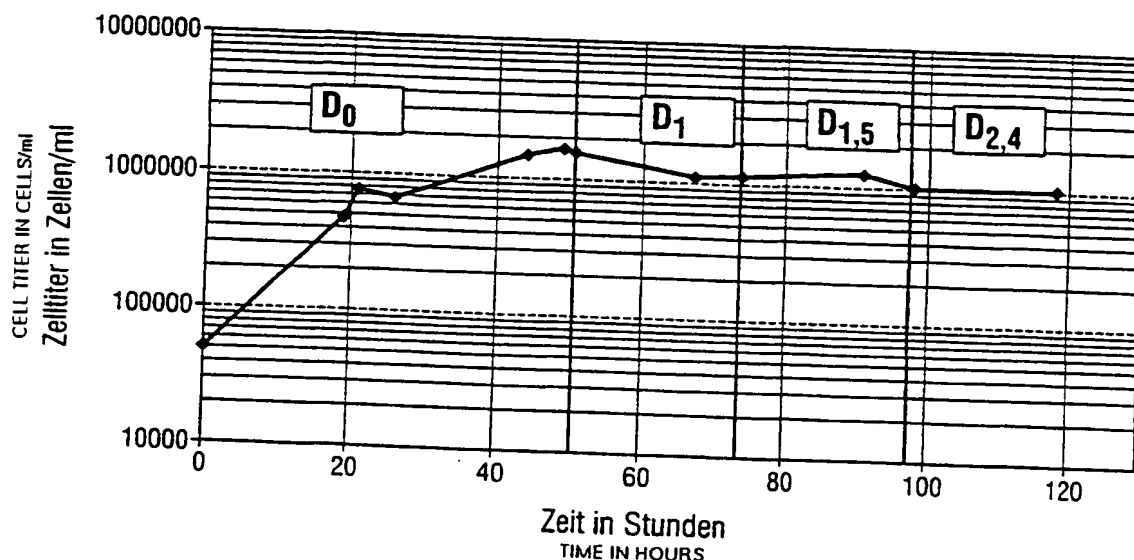
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International patent classification<sup>6</sup>: C12N 9/10</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International publication number: WO 99/15634</p> <p>(43) International publication date: 1 April 1999 (01.04.99)</p>
<p>(21) International application number: PCT/EP98/05770</p> <p>(22) International filing date: 10 September 1998 (10.09.98)</p> <p>(30) Data relating to the priority: 197 41 489.3 19 September 1997 (19.09.97) DE</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG [DE/DE]; Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K801, D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): KIY, Thomas [DE/DE]; Loreleistrasse 14, D-65929 Frankfurt (DE).</p>		<p>(81) Designated states: JP, US, European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Published</b> <i>With the International Search Report. Before expiry of the period provided for amending the claims; will be republished if such amendments are received.</i></p>

As printed

(54) Title: FERMENTATION METHOD WITH CONTINUOUS MASS CULTIVATION OF CILIATES (PROTOZOA) FOR PRODUCING BIOGENOUS VALUABLE SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: FERMENTATIONSVERFAHREN MIT KONTINUIERLICHER MASSENKULTIVIERUNG VON CILIATEN (PROTOZOA) ZUR PRODUKTION BIOGENER WERTSTOFFE



## (57) Abstract

The invention relates to a fermentation method with continuous mass cultivation of ciliates (protozoa) in which the ciliate cells are cultivated in a complex axenic medium free of living feeding organisms or predatory organisms. The biomass containing the desired biogenous valuable substances are obtained by means of continuous (permanent) cell extraction.



# Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe, bei dem die die biogenen Wertstoffe enthaltende Biomasse durch kontinuierlichen (permanenten) Zellaustrag gewonnen werden.

Die biotechnologische Nutzung von Ciliaten - einer Klasse der Protozoen - ist bisher nur ansatzweise realisiert, obwohl zahlreiche Stoffwechselprodukte dieser Organismen von wirtschaftlichem Interesse sind, z.B. lysosomale Enzyme. Derzeit sind nur wenige biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von biogenen Wertstoffen aus Ciliaten beschrieben, - vorwiegend für das Ciliat *Tetrahymena* (Kiy & Tiedtke, 1991, Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 14; Kiy et al., 1996, Enzyme Microb. Technol., 18, 268; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 141), - und es handelt sich hierbei ausschließlich um Verfahren zur Gewinnung von ausgeschiedenen Zellprodukten, d.h. von solchen Zellprodukten, die von den Ciliatenzellen ins Kulturmedium abgegeben werden. Bei dieser Art von Verfahren werden die Ciliaten in Fermentern kultiviert und das die ausgeschiedenen biogenen Wertstoffe enthaltende Kulturmedium wird periodisch, in mehr oder weniger regelmäßigen Zeitabständen, abgenommen und gegen frisches Medium ausgetauscht. Während des Mediumaustauschs werden die Ciliaten über bestimmte Verfahren - z.B. den Einsatz von Membranen, eine Zellimmobilisierung o.ä. - im Fermenter zurückgehalten, so daß praktisch kein Zellmaterial verloren geht und die Zellkultur im Prinzip permanent fortbesteht.

Zur Gewinnung von biogenen Wertstoffen, die zellgebunden vorliegen, ist es jedoch nötig, die gesamten Zellen, die sog. Biomasse, zu ernten. Zu diesem Zweck wird in der Regel - d.h. bei den allgemein bekannten Fermentationsverfahren mit Bakterien oder Pilzen als Wertstoffproduzenten - eine sog. Batch-Fermentation durchgeführt, bei der der Fermenter angeimpft wird und die Zellen solange kultiviert werden, bis die

maximale Biomasse bzw. Produktkonzentration erreicht ist. Dann wird die Biomasse geerntet. Derartige Verfahren sind auch bereits für verschiedene Ciliaten wie Paramecium, Colpoda und Tetrahymena beschrieben worden (Proper & Garver, 1966, Biotechnol. Bioeng., 8, 287, Schönefeld et al., 1986, J. Protozool., 33, 222; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 576).

Die Batch-Fermentations-Verfahren haben jedoch den grundsätzlichen Nachteil, daß sie ein intervallmäßiges Reinigen, neues Animpfen des Fermenters und eine intensive Überwachung und Pflege der Zellkultur - vor allem während der kritischen Anwachsphase - erfordern.

Aus der Fermentationstechnik mit Bakterien oder Hefen als Wertstoffproduzenten ist neben dem Batch-Fermentationsverfahren auch das "kontinuierliche Fermentationsverfahren" bekannt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen im Fermenter bis zu einer bestimmten Zelldichte gezüchtet und dann ständig durch kontinuierlichen Zellaustrag aus dem Fermenter geerntet während gleichzeitig im selben Umfang frisches Kulturmedium zugeführt wird. Die pro Zeiteinheit entnommene Zellmenge (der Zellaustrag) ist so bemessen, daß die im Fermenter verbleibenden Zellen die durch die Ernte bedingte Abnahme der Zelldichte durch kontinuierliche Zellteilungen mühelos wieder ausgleichen können. Im Bereich einer bestimmten Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate „D“ bleibt die Zelldichte im Fermenter somit konstant, obwohl kontinuierlich Kultur und damit das gewünschte Produkt geerntet wird.

Prinzipiell ist dieses kontinuierliche Fermentationsverfahren einer Batch-Fermentation ökonomisch weit überlegen, aber seine Durchführung setzt voraus, daß die kultivierten bzw. gezüchteten Organismen relativ schnell und gleichmäßig wachsen und sich vermehren, und daß sie unempfindlich gegen die Rühr- und Scherkräfte sind, die bei einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren auftreten.

Von Ciliaten ist hingegen allgemein bekannt, daß sie häufig nur sehr langsam wachsen und sich vermehren, daß sie unterschiedliche Wachstumsphasen durchlaufen, und daß sie sehr empfindlich auf Rühr- und Scherkräfte reagieren (Curds

& Cockburn, 1971, Journal of General Microbiology 66, 95-109; Middler & Finn, 1966, Biotechnology and Bioengineering 8, 71-84). Zwar sind auch schon Versuche zur kontinuierlichen Massenkultivierung von Ciliaten beschrieben worden, aber ausschließlich unter Verwendung von bakterienhaltigen Kulturmedien und mit Ergebnissen zur maximalen Zelldichte von wenigen Zehntausend Zellen pro ml trotz 10 Tagen Kultivierung und länger (Curds & Cockburn, supra).

Solche Zelldichten sind für einen Einsatz im großtechnischen, industriellen Maßstab völlig unzureichend. Darüberhinaus ist die von Curds & Cockburn beschriebene Kultivierung auch deshalb für einen großtechnischen Einsatz gänzlich ungeeignet, weil sie die Verwendung von beuteorganismen-, nämlich bakterienhaltigem Medium vorschreibt. Bei einem bakterienhaltigen Kulturmedien kommt es selbstverständlich auch zu einer ständigen Weitervermehrung der Bakterien, und zwar im Umfang abhängig davon, wieviele Ciliaten vorhanden sind. Das Koexistenzgleichgewicht von Ciliatenpopulation und Bakterienpopulation ist sehr labil, und schon ein geringfügiger Eingriff kann gravierende Veränderungen bei beiden Populationen hervorrufen. \*

Die Versuche von Curds & Cockburn liegen überdies mehr als 25 Jahre zurück und haben die Fachwelt offensichtlich in ihrer Meinung bestärkt, daß Ciliaten für ein kontinuierliches Fermentationsverfahren im großtechnischen Maßstab nicht geeignet sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation durch Ciliaten mit Zellaustrag bereitzustellen, bei dem die genannten Nachteile vermieden sind und das insbesondere für den großtechnischen, industriellen Einsatz gut geeignet ist.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens der Eingangs genannten Art, bei dem die Ciliatenzellen in komplexem, axenischem Medium kultiviert werden.

Im Sinne dieser Erfindung bedeutet komplexes Medium ein Nährmedium wäßriger Lösung von Naturprodukten bzw. aus diesen gewonnenen Extrakten zur Kultivierung von Mikroorganismen.

Im Sinne dieser Erfindung bedeutet axenisches Medium ein, von Futter- und Beuteorganismen (sogenannte Nahrungsorganismen) freies Nährmedium.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß ein kontinuierliches Fermentationsverfahren mit Zellaustrag unter Verwendung komplexer axenischer Medien auch mit reinen Ciliatenkulturen erfolgreich und wirtschaftlich außerordentlich rentabel durchführbar ist. Kontinuierliche Zelldichten in der Größenordnung von 1 Millionen Zellen pro ml sind ohne weiteres realisierbar, im Fall von Tetrahymena bereits ab dem dritten Tag nach Beginn der Kultivierung. Damit ist das Vorurteil der Fachwelt überwunden, daß Ciliaten für eine kontinuierliche Massenkultivierung mit Zelldichten von mehreren Hunderttausend bis Millionen Zellen pro ml unter Einsatz von bekannten Fermentern und in Gegenwart der üblicherweise zusammen auftretenden Scherkräfte, in axenischem Medium - d.h. ohne lebende Futter- bzw. Beuteorganismen - nicht geeignet sind, weil:

- sie zu langsam und zu ungleichmäßig wachsen,
- sie nur geringe Widerstandskräfte gegen Rühr- und Scherkräfte haben und sehr leicht und schnell durch solche Kräfte geschädigt bzw. zerstört werden, und
- bei den bisherigen Kultivierungsversuchen trotz Verwendung von Beuteorganismenhaltigem Medium und damit weitgehend naturgetreuem Nahrungsangebot nur verhältnismäßig sehr geringe maximale Zelldichten erreicht wurden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es erstmals möglich, Ciliaten zur großtechnischen Produktion von zellgebundenen biogenen Wertstoffen einzusetzen und damit insbesondere solche Wertstoffe, die nur von Ciliaten bekannt sind, wie z.B. Taurolipide und Tetrahymanol, oder die speziell von Ciliaten in großem Umfang gebildet werden, wie z.B. Gamma-Linolensäure, Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, Octatetraensäure und Arachidonsäure, in wirtschaftlich bedeutendem Umfang zu gewinnen.

Da die Ciliaten als Reinkultur - d.h. frei von anderen lebenden Organismen - gehalten werden, sind wesentliche Störfaktoren von vorne herein vermieden, und auch der



technische Aufwand ist auf ein Mindestmaß beschränkt: Fermenter zur Nachzucht der Beuteorganismen sind beispielsweise vollständig entfallen.

Zu den Produkten, die aus der ausgetragenen Biomasse gewonnen werden können, gehören Peptide und Proteine, vor allem Enzyme (z.B.  $\beta$ -Hexosaminidase, L-Asparaginase, Diisopropylfluorophosphatase, Glucosidase, Fucosidase, Phosphatase Nuklease oder Cathepsin.L), Fettsäuren und Lipide (z.B. Gamma-Linolensäure, Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, Octatetraensäure, Arachidonsäure, Phosphonolipide, Taurolipide, oder Tetrahymanol), Polysaccharide, Nukleinsäuren, Sekundärmetabolite, Polymerer, u.a..

Auch die Biomasse als solche kann das Produkt sein.

Die Gruppe der Ciliaten, die sich mittels des beschriebenen Verfahrens kultivieren lassen, umfaßt alle taxonomischen Ciliaten-Untergruppen, die sich prinzipiell in konventionellen Stand- und/oder Schüttelkulturen bzw. Batch-Fermentationen auf axenischen Nährmedien bzw. Nährmedien, die als Nährstoff abgetötete Biomasse eines Futterorganismus enthalten, kultivieren lassen. Dies sind insbesondere die Ciliatenunterklassen Holotricha, Peritricha, Spirotricha und Suctoria und ganz besonders die Gattungen Tetrahymena, Paramecium, Colpoda, Glaucoma, Parauronema, Engelmanniella, Stylonichia, Euplotes und Colpidium (Klassifizierung nach K. Hausmann: Protozoologie, Thieme Verlag, 1985). Die Erfindung ist auch nicht auf Wildstämme beschränkt, sondern schließt Mutanten und rekombinante Stämme ein.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Fermentation in einem Rühr-, oder Blasensäulen- oder Airliftfermenter durchgeführt.

Während der Fermentation kann der pH-Wert reguliert werden, vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von pH 4 bis pH 9.

Die Fermentationstemperatur liegt je nach Ciliatenspezies zwischen 15 und 40°C.

Als Kohlenstoff-Quelle wird vorzugsweise wenigstens eine der nachfolgend aufgelisteten Substanzen verwendet, nämlich: Glucose, Fructose, Xylose, Saccharose,

Maltose, Stärke, Fucose, Glucosamin, Lactose, Melasse, Dextran, Fettsäuren (z.B. Ölsäure), Sojaöl, Sonnenblumenöl, Glycerin, Glutaminsäure, Mannitol, Magermilchpulver oder Acetat.

Die Konzentration der Kohlenstoff-Quelle sollte zwischen 0,2 und 20 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, liegen.

Als Stickstoff-Quelle wird vorzugsweise wenigstens eine der nachfolgend aufgelisteten Substanzen verwendet, nämlich: Peptone, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Magermilchpulver, Casamino Acid, Corn Steep Liquor, organische Stickstoff-Quellen wie Na-Glutamat und Harnstoff, anorganische Stickstoff-Quellen wie Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat.

Die Konzentration der Stickstoff-Quelle sollte zwischen 0,1 und 10 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, liegen.

Bei einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem Kulturmedium wenigstens eine Phosphatquelle, z.B. Kaliumphosphat oder Kalium-Dihydrogenphosphat, zugesetzt. Alternativ oder kumulativ kann auch Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Magnesium, Eisen, Kupfer, Calcium, Vitamine, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, um die Wachstums- und Vermehrungsrate der betreffenden Ciliatenkultur weiter zu optimieren.

Die kontinuierlich geerntete Biomasse wird vom Kulturmedium vorzugsweise mittels Zentrifugation, Tangentialfiltration, Mikrofiltration, Sedimentation, Flotation oder Separatoren abgetrennt. Andere Methoden sind aber ebenfalls denkbar.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate  $D$  (= täglich ausgetauschtes Volumen / Arbeitsvolumen des Fermenters) im Bereich von 0,1 bis 12 (=1/10 bis 12/1) je nach Wachstumsrate des Ciliatenstammes.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena pyriformis*

*Tetrahymena pyriformis* wurde in einem 2 l Fermenter des Typs Biostat MD (Braun Biotech, Melsungen) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 0,5 Gewichts-% Proteose Pepton
- 0,1 Gewichts-% Hefeextrakt
- 3 Gewichts-% flüssiger Stärkezucker
- 1 ml/l Eisenspur

Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 30°C
- Sauerstoffsättigung: 20 %
- pH-Regulierung: pH 7
- Start ( $t_{0h}$ ): Inokulum 50.000 Zellen / ml; Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierlichen Fermentation:  $t_{51h}$  mit  $D = 1$ ;
- Fortsetzung der kontinuierlichen Fermentation: ab  $t_{78h}$  mit  $D = 1,5$ ; ab  $t_{98h}$  mit  $D = 2,4$

Zu Beginn der Kultivierung wurde das Medium mit etwa 50.000 Zellen angeimpft und diese Starterkultur nach Art eines Batch-Verfahrens so lange kultiviert, bis die Zellpopulation am Ende der Vermehrungsphase und kurz vor dem Eintritt in die stationäre Phase stand. Zu diesem Zeitpunkt - im vorliegenden Beispiel 51 Stunden nach der Animpfung ( $t_{51h}$ ) - wurde auf kontinuierliche Fermentation umgestellt, d.h. von da an wurde kontinuierlich zellhaltiges Medium abgenommen und die entsprechende Menge zellfreies Medium zugeführt. Zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation betrug die Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate (=Volumenmenge an täglich ausgetauschtem Medium pro Arbeitsvolumen des Fermenters)  $D=1$ , d.h. pro Tag wurde der gesamte Inhalt des Fermenters (2 l) einmal ausgetauscht und 2 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen. Dieses Medium enthielt etwa 1 Millionen Zellen pro ml.

27 Stunden nach Beginn der kontinuierlichen Fermentation (= 78 Stunden nach der Animpfung =  $t_{78h}$ ) wurde die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate auf  $D=1,5$  erhöht, d.h. pro Tag wurden ab diesem Zeitpunkt etwa 3 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen. Die Zelldichte blieb dabei praktisch unverändert bei etwa 1 Millionen Zellen pro ml. Nach weiteren 20 Stunden (= 98 Stunden nach der Animpfung =  $t_{98h}$ ) wurde die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate nochmals erhöht auf  $D=2,4$ , d.h. pro Tag wurden etwa 5 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen, wobei die Zelldichte nach wie vor praktisch unverändert bei etwa 1 Millionen Zellen / ml lag.

Die Ergebnisse dieses Fermentationsprozesses sind in Fig. 1 graphisch dargestellt. Aus dem dort abgebildeten Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß es trotz kontinuierlichem Zellaustrag zu keiner Ausverdünnung kam, sondern eine ständige und kontinuierliche Vermehrung der Ciliaten stattfand. Mit anderen Worten: die Kultur befand sich auch bei größerem Zellaustrag ( $D=2,4$ ) immer in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zellaustrag und Zellvermehrung.

Beispiel 2: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena thermophila*

*Tetrahymena thermophila* wurde in einem 2 l Fermenter des Typs Biostat MD (Braun Biotech, Melsungen) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 5 g/l Proteose Pepton
- 1 g/l Hefeextrakt
- 1 ml/l Eisenspur
- 1 Gewichts-% Glucose in Form von flüssigem Stärkezucker

Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 30°C
- Sauerstoffsättigung: 20 %
- pH-Regulierung: pH 7
- Start ( $t_{0h}$ ) : Inokulum 50.000 Zellen / ml; Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art

- Beginn der kontinuierliche Fermentation:  $t_{45h}$  mit  $D = 1,2$ ;
- Fortsetzung der kontinuierlichen Fermentation: ab  $t_{178h}$  mit  $D = 2,4$ ; ab  $t_{190h}$  mit  $D = 3$

Das Verfahren wurde im Prinzip wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

In Fig. 2 ist das Wachstums- bzw. Vermehrungsverhalten der Ciliatenpopulation unter den genannten Fermentationsbedingungen graphisch darstellt. Aus dem abgebildeten Kurvenverlauf ist erkennbar, daß die Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate von  $D=1,2$  auf  $D=2,4$  (Verdoppelung) zu einer Abnahme der Zelldichte von etwa 1 Millionen Zellen/ml auf etwa 500.000 Zellen/ml (Halbierung) führte, daß diese Zelldichte dann aber relativ konstant blieb und nicht weitere abnahm, selbst bei einer weiteren Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate von  $D=2,4$  auf  $D=3$ .

### Beispiel 3: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena thermophila*

#### Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 20 g/l Magermilchpulver
- 10 g/l Glucose
- 5 g/l Hefeextrakt
- 1 ml/l Eisenspur

#### Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 30°C
- Sauerstoffsättigung: 20 %
- Rührer: als 2. Kaskade für Sauerstoffregulation
- pH-Regulierung: pH 7
- Start ( $t_{0h}$ ): Inokulum 50.000 Zellen / ml; Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierlichen Fermentation:  $t_{20h}$  mit  $D = 1,125$ ;
- Fortsetzung der kontinuierlichen Fermentation ab  $t_{68h}$  mit  $D = 1,9$ ;  
ab  $t_{139h}$  mit  $D = 4,14$ ;

Das Verfahren wurde im Prinzip wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

In Fig. 3 ist das Wachstums- bzw. Vermehrungsverhalten der Ciliatenpopulation unter den vorstehend genannten Fermentationsbedingungen graphisch dargestellt. Der abgebildete Kurvenverlauf zeigt, daß es zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation zu einer Abnahme der Zelldichte von anfänglich etwa 1 Millionen Zellen pro ml auf etwa 600.000 Zellen pro ml kam. Die Zellpopulation erholte sich aber wieder trotz einer Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate innerhalb von 1,5 Tagen (etwa 36 Stunden), und hatte etwa 4 Tage (90 Stunden) nach Beginn der kontinuierlichen Fermentation wieder ihre Ausgangsdichte von 1 Millionen Zellen pro ml erreicht. Dieser Wert wurde auch bei weiterer Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate auf  $D=4,1$  und schließlich auf  $D=4,9$  nicht mehr unterschritten.

In der unteren Kurve in Fig. 3 sind die Ergebnisse von Bestimmungen des Trockengewichts der Zellen (in g pro l) während der Kultivierungsdauer dargestellt. Aus dem im wesentlichen parallel zur Zellvermehrungskurve verlaufenden Kurvenverlauf ist erkennbar, daß die Zellvermehrung nicht auf Kosten der Zellgröße bzw. des Zellvolumens der einzelnen Ciliatenzellen erfolgt, sondern daß tatsächlich entsprechend mehr Biomasse produziert wird.

#### Beispiel 4: Kontinuierliche Fermentation von *Colpidium campylum*

*Colpidium campylum* wurde in einem 2-l Fermenter des Typs Biostat MD (Braun Biotech. Melsungen) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 20g/l Magermilchpulver
- 10 g/l Glucose
- 5 g/l Hefeextrakt
- 1ml/l Eisenspur

## Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 25°C
- Sauerstoffsättigung: 20%
- Rührer: 108 upm
- pH-Regulierung: pH 7
- Start (  $t_{0h}$  ) : Inokulum 50.000 Zellen / ml; Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierlichen Fermentation:  $t_{114,75h}$  mit  $D = 0,665$ ;
- Fortsetzung der kontinuierlichen Fermentation ab  $t_{140h}$  mit  $D = 0,632$   
ab  $t_{159h}$  mit  $D = 0,462$

Das Verfahren wurde im Prinzip wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

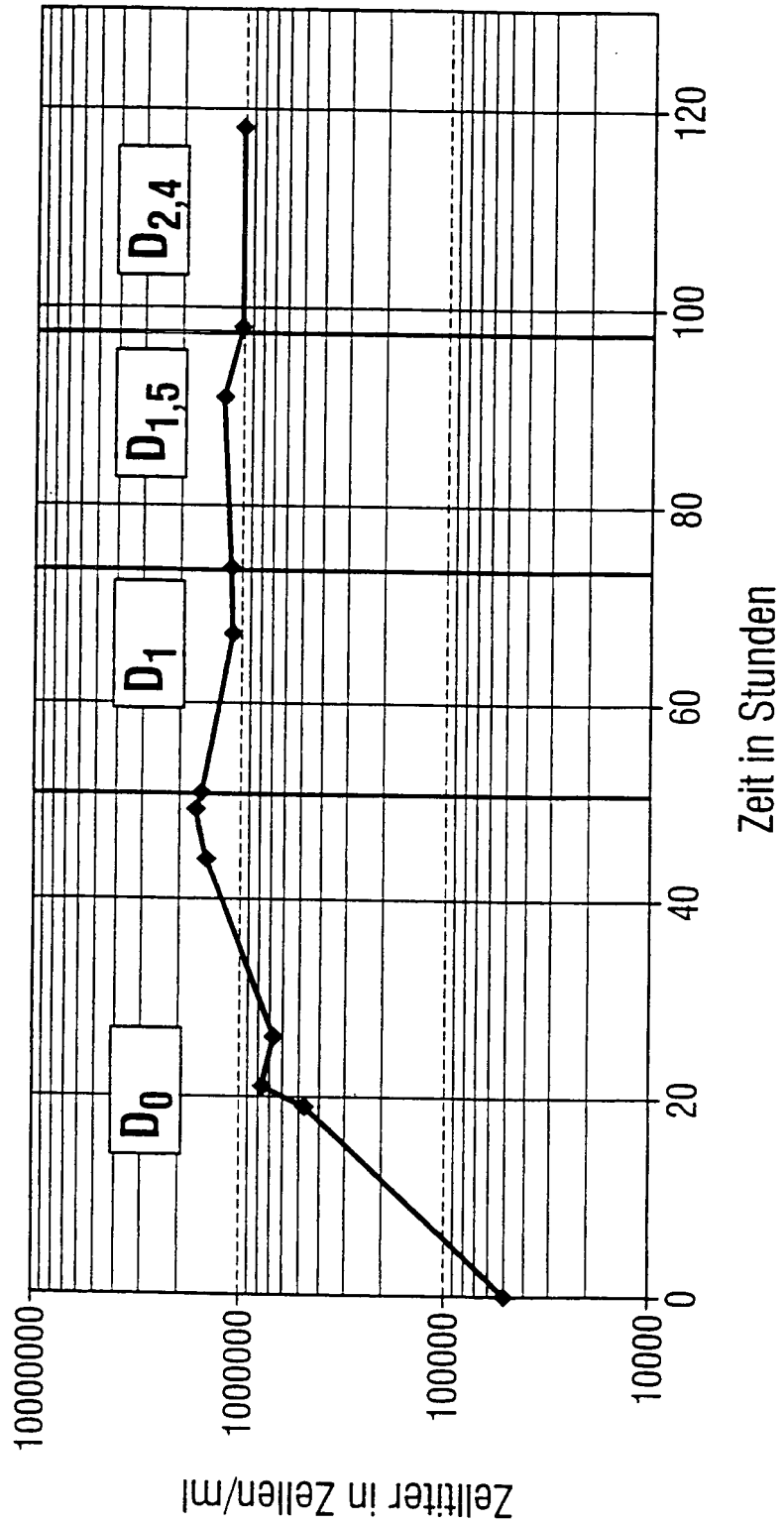
## Ansprüche

1. Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe, bei dem die die biogenen Wertstoffe enthaltende Biomasse durch kontinuierlichen Zellaustrag gewonnen wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen in komplexem axenischem Medium kultiviert werden.
2. Fermentationsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliaten einer der taxonomischen Gruppen Holotricha, Peritricha, Spirotricha und Suctoria, insbesondere die Gattungen Tetrahymena, Paramecium, Colpoda, Glaucoma, Parauronema, Engelmanniella, Stylonichia, Euplotes und Colpidium, angehören, wobei neben den Wildstämmen auch Mutanten und/oder Rekombinanten dieser Stämme umfaßt sind.
3. Fermentationsverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation in einem Rühr- oder Blasensäulen- oder Airliftfermenter durchgeführt wird.
4. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei einem pH-Wert im Bereich von pH 4 bis pH 9 und/oder einer Fermentationstemperatur im Bereich von etwa 15 bis etwa 40°C durchgeführt wird.
5. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium eine Kohlenstoff-Quelle enthält, die eine oder mehrere Substanzen aus der Gruppe: Glucose, Fructose, Xylose, Saccharose, Maltose, Stärke, Fucose, Glucosamin, Lactose, Melasse, Dextran, Fettsäuren (z.B. Ölsäure), Sojaöl, Sonnenblumenöl, Glycerin, Glutaminsäure, Mannitol, Magermilchpulver und Acetat umfaßt.



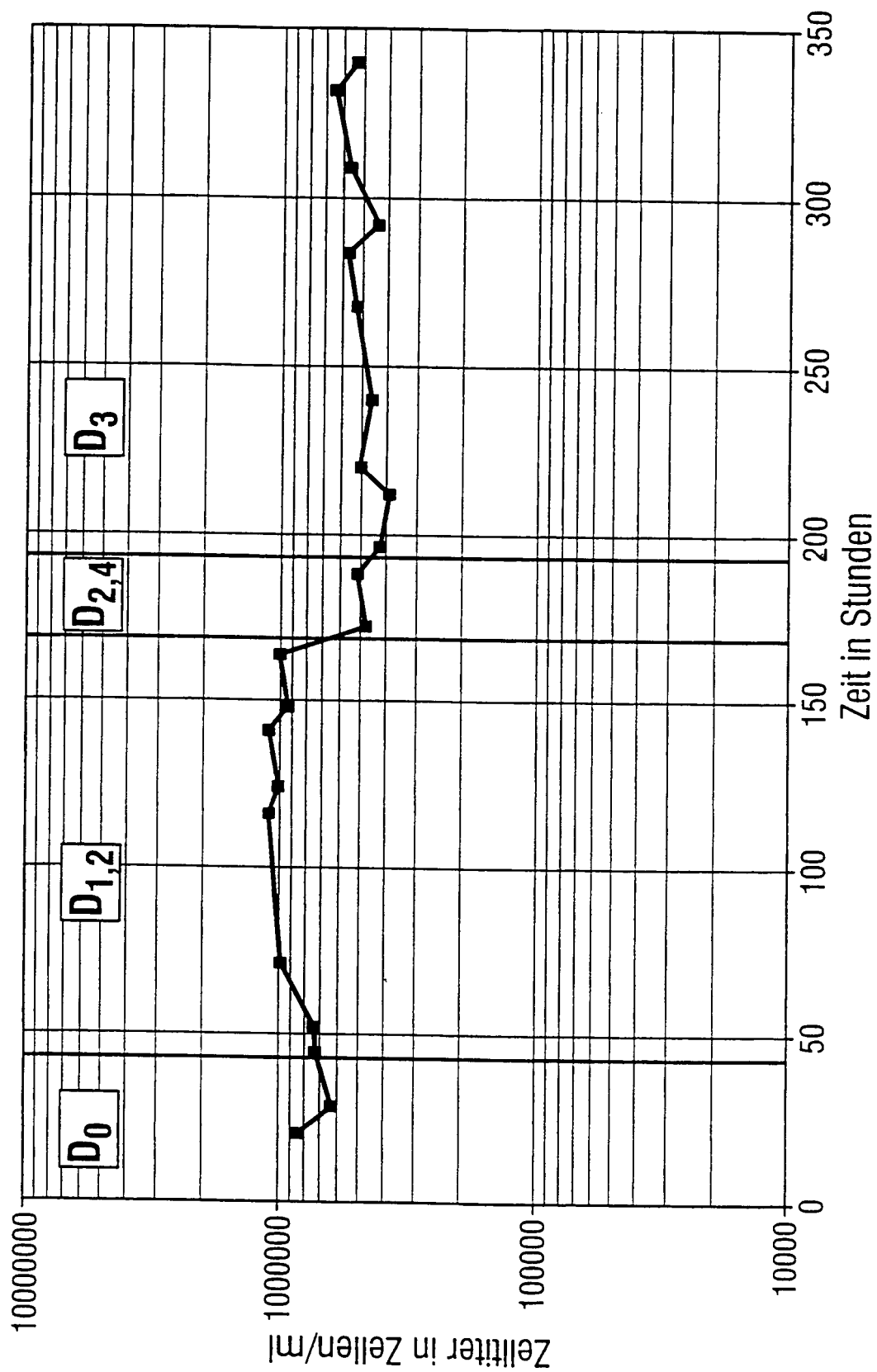
6. Fermentationsverfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Kohlenstoff-Quelle einen Wert im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 20 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, beträgt.
7. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium eine Stickstoff-Quelle enthält, die eine oder mehrere Substanzen aus der Gruppe: Peptone, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Magermilchpulver, Casamino Acid, Corn Steep Liquor, Na-Glutamat, Harnstoff, Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat umfaßt.
8. Fermentationsverfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Stickstoff-Quelle einen Wert im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 10 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, beträgt.
9. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium wenigstens eine Phosphatquelle enthält, vorzugsweise Kaliumphosphat und/oder Kalium-Dihydrogenphosphat.
10. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium eine oder mehrere der folgenden Substanzen enthält: Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Magnesium, Eisen, Kupfer, Calcium, Vitamine, Spurenelemente.
11. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium abgetötete Biomasse von Futterorganismen der Ciliaten enthält.
12. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die im Zellaustrag enthaltenen Zellen (= geerntete Biomasse) mittels Zentrifugation und/oder Tangentialfiltration und/oder Mikrofiltration und/oder Sedimentation und/oder Flotation vom Kulturmedium abgetrennt wird.

13. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate ( = täglich ausgetauschtes Volumens / Arbeitsvolumen des Fermenters) einen Wert im Bereich von 0,1 bis 12 beträgt.
14. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die biogenen Wertstoffe eine oder mehrere Substanz(en) aus der Gruppe, bestehend aus: Peptiden und Proteine, insbesondere Enzymen, Fettsäuren und Lipide, Polysaccharide, Nukleinsäuren, Sekundärmetabolite und Polymere, sind oder aber die Biomasse selbst einen Wertstoff (z.B. Tierfutter) darstellt.

**Fig. 1**

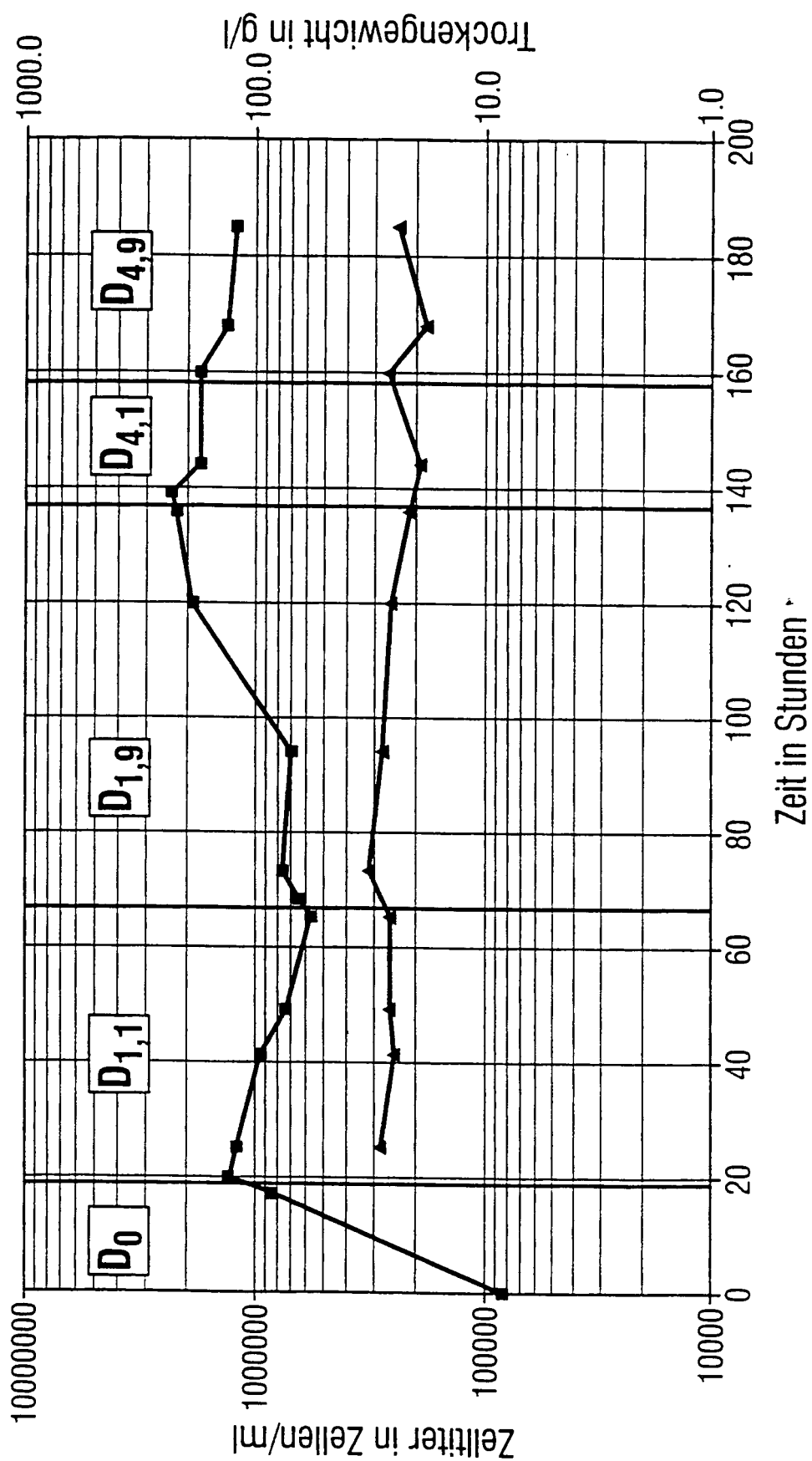
430 Rec'd PCT/PTO 17 MAR 2000

2 / 3

**Fig. 2**

430 Rec'd PCT/PTO 17 MAR 2000

### **Fig. 3**



430 Rec'd PCT/PTO 17 MAR 2000



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N9/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 66, no. 5, 30. Januar 1967 Columbus, Ohio, US; abstract no. 17297, ROSENBAUM, NANCY ET AL: "Induction of a phospholipid requirement and morphological abnormalities in Tetrahymena pyriformis by growth at supraoptimal temperatures" XP002090950 siehe Zusammenfassung & J. PROTOZOOL. (1966), 13(4), 535-46 CODEN: JPROAR,  --- -/-	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Delanghe, L

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 94, no. 9, 2. März 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 61384, YAMIN, MICHAEL A.: "Cellulose metabolism by the flagellate Trichonympha from a termite is independent of endosymbiotic bacteria" XP002090951 siehe Zusammenfassung & SCIENCE (WASHINGTON, D. C., 1883-) (1981), 211(4477), 58-9 CODEN: SCIEAS;ISSN: 0036-8075, ----	1
Y	DE 42 38 842 A (GERMANY) 19. Mai 1994 siehe Ansprüche ----	1
Y	FR 2 334 630 A (BATTELLE MEMORIAL INST) 12. August 1977 siehe Ansprüche ----	1
Y	WILLIAM TRAGER ET AL.: "Human malaria parasites in continuous culture" SCIENCE, Bd. 193, 20. August 1976, Seiten 673-675, XP002090949 US siehe das ganze Dokument ----	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 76, no. 9, 28. Februar 1972 Columbus, Ohio, US; abstract no. 43778, VAN WAGTENDONK, W. J. ET AL: "Axenic cultivation of Paramecium aurelia" XP002090952 siehe Zusammenfassung & METHODS CELL PHYSIOL. (1970), 4, 117-30 CODEN: MCPHA6, ----	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26. Mai 1969 Columbus, Ohio, US; abstract no. 94181, CURDS, C. R. ET AL: "Growth and feeding of Tetrahymena pyriformis in axenic and monoxenic culture" XP002090953 siehe Zusammenfassung & J. GEN. MICROBIOL. (1969), 54(3), 343-58 CODEN: JGMIAN, 1969, -----	1

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05770

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4238842	A	19-05-1994	KEINE	
FR 2334630	A	08-07-1977	BE 849148 A	07-06-1977
			DE 2655614 A	16-06-1977
			JP 52081299 A	07-07-1977
			NL 7613363 A	10-06-1977

